Der Einfluß der Blausäure auf die Wirkung der Bakterienproteasen

Von

G. Gorbach und A. Schönbeck

(Aus dem Biochemischen Institut der Technischen Hochschule Graz, Vorstand: Prof. Fuhrmann)

(Vorgelegt in der Sitzung am 10. November 1932)

Seit der Beobachtung von Vines (1), daß der fermentative Abbau von Eiweißkörpern durch das Papain bei Zugabe geringer Mengen von Blausäure weitgehend beschleunigt werden kann, hat sich eine Reihe von Forschern mit der Untersuchung dieser interessanten Aktivierung beschäftigt. Die Arbeiten dieser haben zu dem Ergebnis geführt, daß der Blausäurezusatz nicht allein das Papain, sondern eine Reihe anderer proteolytisch wirkender Enzyme der tierischen (2) und pflanzlichen Zelle (3) in der Abbauwirkung günstig zu beeinflussen vermag. Außer der Blausäure wirken Schwefelwasserstoff, Thiosulfat, Citrat, Pyrosulfat (4) und auch andere reaktionsbeschleunigend auf die Eiweißspaltung durch Zellfermente. Von größerer Bedeutung ist die Beobachtung, daß Sulfhydrylverbindungen, wie Cystein und reduziertes Glutathion, Stoffe, welche die lebende Zelle zu bilden vermag, die gleichen Aktivierungserscheinungen zeigen. In neuester Zeit wurde im Glutathion geradezu der natürliche Aktivator für den fermentativen Eiweißabbau der tierischen (5) und pflanzlichen (6) Zelle erkannt.

Der Mechanismus der Blausäurewirkung ist noch nicht klargestellt. Eine schon auf Vines (1) und Mendel und Blood (7) zurückgehende Annahme hat viel für sich, die dahingeht, daß durch die Blausäure die als Fermentgifte wirkenden Schwermetallverunreinigungen des Subtrats infolge von Metallkomplexbildungen unschädlich gemacht werden, eine Auffassung, die neuerdings von Krebs (4) auf Grund seiner Untersuchungen vertreten wird. Diese an sich sehr einfache Erklärung wird aber durch die Arbeiten von Stern (8) deshalb in Frage gestellt, weil nach seinen Ergebnissen nicht alle Metallverunreinigungen hemmend wirken und auch die Wirkung der Metallkomplexe nicht in jedem Fall indifferent, sondern hemmend oder fördernd sein kann. Dazu kommt noch, daß Stoffe, die zur Komplexbildung gar nicht geeignet sind (9), ebenfalls reaktionsbeschleunigend auf den fermentativen Abbau von Eiweißkörpern zu wirken vermögen. Willstätter und Graßmann (10) erklärten die Blausäurewirkung durch die Annahme einer Verbindung der Blausäure mit dem Enzym. Nach ihren Untersuchungen

©Akademie der Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

baut das Papain allein Eiweißkörper nur bis zu den Peptonen ab, während diese erst durch das mit Blausäure aktivierte Enzym, das Papaincyanhydrin, weiter hydrolysiert werden können.

Die Untersuchung der Bakterienproteasen hat Gorbach (11) unter Anwendung der durch die Enzymforschung der letzten Jahre gewonnenen Erfahrungen wieder aufgenommen. Dabei wurde unter anderem auch der Einfluß der Blausäure auf die Bakterienproteasen durch einige Versuche studiert. Sie führten zu dem Ergebnis, daß die proteolytischen Fermente des *Bacillus pyocyaneus* bei Zusatz von Blausäure Eiweißkörper bedeutend stärker spalten. In diesem Sinne berichtete in der Folge auch Tarnanen (12), welcher den Einfluß der Blausäure auf den Eiweißabbau durch die Fermente des *Bacillus casei* ε untersuchte.

Im Gegensatz zu diesen Befunden stehen die Untersuchungen von Gorini, Graßmann und Schleich (13). Sie fanden bei ihren Versuchen mit den Acidoproteolyten Gorini's, daß die Fermente dieser Bakteriengruppe durch Blausäure gehemmt werden.

Im folgenden werden die Versuchsergebnisse mitgeteilt, welche wir bei der Untersuchung der proteolytischen Fermente des *Bacillus pyocyaneus* mit und ohne Zugabe von Blausäure erhalten haben. Wir verwendeten für diese Versuche Kulturfiltrate verschiedener Zusammensetzung und verschiedenen Alters. Es wurde ihre Wirkung auf Gelatine, Kasein und Witte-Pepton unter dem Einfluß der Blausäure festgestellt, wobei auch die p_H-Abhängigkeit der Blausäurewirkung Berücksichtigung fand. Im Anschluß daran haben wir noch einige Versuche ausgeführt, welche in den Mechanismus der Blausäurewirkung einen Einblick gewähren sollen.

Versuchstechnik.

Im allgemeinen wurde die Versuchstechnik der ersten Mitteilung (11) beibehalten. Zur Zucht benutzten wir den *Pyocyaneus*-Stamm III, welcher sich durch eine besonders gute Bildung proteolytischer Fermente auszeichnet. Die Zuchtdauer betrug in jedem Fall 10 Tage und die Zuchttemperatur 20° C. Nach dieser Zeit wurden die erhaltenen Kulturen mit Toluol abgetötet und entweder frisch, zumeist aber nach längerem Stehen für die Versuche verwendet. Die auf diese Art erhaltenen Enzymlösungen wurden vor ihrer Verwendung von den Bakterienzellen und unlöslichen Stoffwechsel- und Abbauprodukten durch Filtration befreit. Für die synthetischen Nährlösungen verwendeten wir die in der ersten Arbeit (11) angeführte, doppelt konzentrierte mineralische Nährlösung. Die dort angegebenen Bezeichnungen, wie »Gelatinekulturfiltrat, beziehungsweise Peptonkulturfiltrat« besagen, daß in einer synthetisch hergestellten Nährlösung gezüchtet wurde, welche als einzige Stickstoffquelle 1% Gelatine, beziehungsweise ½% Pepton-Witte und als Kohlenstoffquelle 1% Glyzerin enthielt. Das Alter der Kulturfiltrate wurde vom Tage des Toluolzusatzes an berechnet.

Zur Bestimmung der Fermentwirkung wurde ein Versuchsansatz von 20 cm^3 verwendet, welcher das Enzym, das Spaltsubstrat und die zur Einstellung der Wasserstoffionenkonzentration notwendige halbmolare Phosphat-, beziehungsweise Azetatpuffermischung enthielt. Für die Blausäureversuche wurden außerdem noch wechselnde Mengen einer neutralisierten (Indikator Lackmus) $^1/_{100}$ molaren Kaliumzyanidlösung hinzugefügt. Die Titration wurde in 4 cm^3 dieses Versuchsansatzes vor und nach Ablauf der Hydrolyse unter Zugabe von Formol vorgenommen (11).

Zu jedem Versuch wurden zwei Versuchsansätze aufgestellt, um Zufallswerte zu vermeiden. Die in den Tabellen angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus beiden Versuchsansätzen und stellen die Zunahme des formoltitrierbaren Stickstoffes in 0·2 normaler Natronlauge dar. Die Versuchsansätze wurden während der Reaktionszeit bei 40° im Thermostaten gehalten. Als Spaltsubstrate verwendeten wir Handelsgelatine (Marke »Gold«), Pulvergelatine der Österreichischen Heilmittelstelle, Kasein nach Hammarsten und Witte-Pepton. Um Infektionen zu vermeiden, wurden diese Substrate, in gesättigtem Thymolwasser gelöst, dem Versuchsansatz zugegeben.

Ausführung der Versuche.

Die durch Zucht erhaltenen Pepton- und Gelatinekulturfiltrate sind nach dem Toluolzusatz bei Zimmertemperatur und Aufbewahrung im Dunkeln lange Zeit hindurch haltbar. Selbst 9 Monate alte Enzymlösungen ergeben kräftige Eiweißspaltung. Es hat sich sogar gezeigt, daß sich Peptonkulturfiltrate beim Stehen aktivieren und ihre Wirksamkeit mit zunehmendem Alter ständig steigt. Der Blausäurezusatz führt zumeist nur bei diesen älteren Kulturfiltraten zu einem stärkeren Abbau. Verwendet man frische Pepton- und Gelatinekulturfiltrate, so wirkt die Zugabe der Blausäure nur wenig oder gar nicht im Sinne einer kräftigen Hydrolyse. Die Blausäure hemmt sogar in manchen Fällen die Wirkung solcher junger Lösungen.

Als Beleg geben wir die in Tabelle I zusammengestellten Versuchsergebnisse, welche wir mit $4^1/_2$ und 9 Monate alten Pepton- und Gelatinekulturfiltraten erhalten haben. Als Spaltsubstrate dienten im Falle der Peptonkulturfiltrate Witte-Pepton und Gelatine, während der Abbau unter dem Einfluß der Blausäure bei den Gelatinekulturfiltraten nur mit Gelatine allein versucht wurde.

Wie aus den Resultaten der Tabelle hervorgeht, wird durch die Blausäure in erster Linie die Spaltung des Peptons beschleunigt. Sie beträgt beim 9 Monate alten Peptonkulturfiltrat nahezu das Doppelte von jener, welche ohne Blausäurezusatz erhalten wird. Beim $4^1/_2$ Monate alten Peptonkulturfiltrat beobachteten wir unter denselben Versuchsbedingungen eine starke Hemmung der Enzymwirkung. Im Parallelversuch mit Gelatine erscheint der Abbau unter dem Einfluß der Blausäure kaum beeinträchtigt. Wir erhielten mit

©Akademie der Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle I

Art der Enzymlösung	Alter der Enzymlösung in Monaten	Spaltung in cm^3 0·2 norm. NaOH/4 cm^3				Substratkonzentration	Puffermischung	Enzymkonzentration	Reaktionsmenge	Reaktionszeit in Stunden
		Gelatine		Pepton						
		ohne KCN	mit 9 *mg* KCN	ohne KCN	mit 9 *mg* KCN					
Peptonkulturfiltrat	4·5	0·21	0·20	0 43	0·36	4%	4 cm^3 ($p_H = 7$)	4 cm^3	20 cm^3	24
	9	0·35	0·36	**0·13**	**0·25**					
Gelatinekulturfiltrat	4·5	0·47	0·50	—	—					
	9	**0·43**	**0·49**	—	—					

und ohne Blausäure fast dieselben Werte. Die Resultate mit dem Gelatinekulturfiltrat (Kolonne 2) zeigen jedoch, daß auch der Abbau der Gelatine durch die Blausäure vertieft wird. Doch erkennt man auch hier, daß das ältere Enzympräparat beim Blausäurezusatz höhere Spaltwerte ergibt als das jüngere. Im Vergleich zum Peptonversuch der oberen Kolonne beträgt die Vertiefung des Abbaues nur etwa 12%.

In einer weiteren Versuchsreihe studierten wir den Einfluß der Blausäuremenge auf den fermentativen Abbau. Für diese Versuche verwendeten wir ein 6 Monate altes Peptonkulturfiltrat. Die Versuchsergebnisse bei wechselnder Blausäurekonzentration und Gelatine, beziehungsweise Pepton als Spaltsubstrat sind in der Tabelle II niedergelegt.

Tabelle II.

Substrat	Spaltungszeit in Stunden	Spaltung in cm^3 0·2 norm. NaOH/4 cm^3 mit KCN in *mg*								Enzymlösung	Puffermischung	Substratkonzentration	Reaktionsmenge
		0	3	6	9	12	15	18	21				
Pepton	24	**0·13**	0·15	0·18	**0·35**	0·32	0·34	0·36	0·35	Peptonkulturfiltrat (6 Mon. alt): 4 cm^3	4 cm^3 ($p_H = 7$)	4%	20 cm^3
Gelatine	24	0·44	0·53	0·52	0·53	0·53	0·52	0·52	0·57				

Aus den Werten dieser Tabelle ist zu ersehen, daß übereinstimmend mit den früheren Ergebnissen hauptsächlich die Peptonspaltung durch den Blausäurezusatz im Sinne des stärkeren Abbaues beeinflußt wird. Das Optimum der Spaltung ergibt sich bei einem Zusatz von 9 *mg* Zyankali zum Probenansatz von 20 cm^3.

Größere Mengen hemmen den Abbau nicht, die Werte bleiben, von den geringen Schwankungen abgesehen, konstant. Die Erhöhung der Spaltwerte beträgt bei optimalem Blausäurezusatz zirka 65%. Im Vergleich zu den Peptonversuchen wird die Gelatinespaltung nur wenig beeinflußt. Schon ein Zusatz von 3 *mg* Zyankali genügt, um diese geringfügige Erhöhung der Wirkung zu erzielen.

Eine Anzahl von Versuchen haben wir zur Feststellung des optimalen p_H-Bereiches für die Blausäurewirkung durchgeführt. Als Substrate für den Abbau verwendeten wir Gelatine, Kasein und Witte-Pepton. Mit einigen Versuchen haben wir auch die Spaltbarkeit des Albuminpeptons (Österreichische Heilmittelstelle) untersucht, welches nach früheren Erfahrungen (11) durch *Pyocyaneus*-Proteasen kaum angegriffen wird. Doch hat sich die Hoffnung, durch Blausäurezusatz einen stärkeren Abbau zu erreichen (p_H-Bereich 6—8) nicht erfüllt. Es wird daher von der Mitteilung dieser Ergebnisse abgesehen. Als Enzymlösungen verwendeten wir Fleischbouillonkulturen mit Peptonzusatz (11), gealterte Peptonkulturfiltrate und Ammonchloridkulturfiltrate, die durch Zucht des *Bacillus pyocyaneus* in synthetischen Nährlösungen mit Glyzerin als Kohlenstoffquelle und Ammonchlorid als Stickstoffquelle (11) erhalten worden sind.

In der Tabelle III sind die Abbauwerte von Gelatine bei Verwendung eines durch Dialyse gereinigten, 1 Monat alten Bouillonpeptonkulturfiltrates verzeichnet.

Tabelle III.

Spaltungszeit in Stunden	Wirkung in cm^3 0·2 norm. NaOH/4cm^3 Probe ohne Zyankalizusatz bei p_H=								Gelatine	Puffermischung	Enzymlösung	Reaktionsmenge
	4·3	5·1	6·4	6·8	7·1	7·5	7·7	8·1				
72	0·10	0·02	0·10	0·9	0·11	0·03	0·05	0·10	4%	4 cm^3	Bouillon-Peptonkulturfiltrat 24h dialys.: 6 cm^3 (1 Monat)	20 cm^3
Spaltungszeit in Stunden	Wirkung in cm^3 0·2 NaOH, 4 cm^3 Probe mit 20 *mg* Zyankali bei p_H =											
	4·5	5·3	6·2	6·6	6·9	7·2	7·6	8·3				
72	0·11	0·08	0·28	0·22	0·26	0·17	0·26	0·18				

Die Spaltwerte sind im Vergleich zu den Pepton- und Gelatinekulturfiltraten im gesamten untersuchten p_H-Bereich gering. Das Optimum der Gelatinespaltung liegt bei $p_H = 7 \cdot 1$. Durch Zusatz von Blausäure erhält man jedoch starke erhöhte Abbauwerte. Die Spaltung der Gelatine erscheint bei allen p_H-Werten mit Ausnahme von $p_H = 4 \cdot 3$ stark gesteigert. Dieselbe Erscheinung einer kräftigen Aktivierung durch die Blausäure zeigen auch Ammonchloridkulturfiltrate, wie es Tabelle IV dartut.

©Akademie der Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle IV

Spaltungszeit in Stunden	Wirkung in cm^3 0·2 norm. NaOH/4 cm^3 Probe ohne Zyankalizusatz bei $p_H =$									Gelatine	Puffermischung	Enzymlösung	Reaktionsmenge
	3·9	4·3	5·0	5·9	6·3	6·8	7·0	7·5	7·7				
48	0·00	0·00	0·00	0·00	0·04	0·00	0·03	0·07	0·10	4%	4 cm^3	Ammonchlorid-Glyzerinkulturfiltrat (11 Tage): 6 cm^3	20 cm^3
72	0·00	0·00	0·00	0·02	0·04	0·05	0·08	0·09	0·10				
168	0·00	0·00	0·00	**0·02**	**0·06**	0·06	0·08	0·12	0·10				

Spaltungszeit in Stunden	Wirkung in cm^3 0·2 norm. NaOH/4 cm^3 Probe mit 20 mg Zyankali bei $p_H =$								
	4·4	4·6	4·7	6·0	6·5	7·0	7·3	7·9	8·3
48	0·08	0·05	0·01	0·14	0·35	0·06	0·09	0·05	0·03
72	0·08	0·06	0·03	0·15	0·41	0·13	0·12	0·05	0·03
168	0·08	0·06	0·04	**0·23**	**0·55**	0·16	0·19	0·14	0·06

Ohne Blausäurezusatz ist die Wirkung dieser Enzymlösung bei allen p_H-Werten gering. Selbst nach 168 Stunden des Gelatineabbaues werden nur Wirkungswerte von zirka $^1/_{10}$ 0·2 norm. Natronlauge verzeichnet. Nach Blausäurezusatz ändert sich das Bild aber vollständig. Schon nach 48 Stunden tritt kräftiger Abbau ein, welcher nach 168 Stunden bereits das neun- bis elffache von jenem beträgt, den man nach dieser Zeit ohne Blausäure beobachtet. Außerdem zeigt sich ein ausgesprochenes Optimum für die Blausäurerktivierung. Es liegt bei $p_H = 6 \cdot 0 - p_H = 6 \cdot 5$, also in jenem Gebiet, welches allgemein für die Peptonspaltung als optimal gilt (11).

Die folgenden Versuche haben wir mit einem gealterten Peptonkulturfiltrat zum Zwecke des Studiums des Abbaues von Kasein, Gelatine und Witte-Pepton bei wechselnden Wasserstoffionenkonzentrationen unter dem Einfluß von Blausäure ausgeführt. Die Spaltung dieser Substrate untersuchten wir nach 6 und 24 Stunden des Abbaues. Die Versuchsergebnisse, welche wir auf diese Weise erhielten, sind für Kasein in Tabelle V mitgeteilt.

Die erhaltenen Abbauwerte zeigen, daß die optimale Spaltung des Kaseins bei neutraler Reaktion des Versuchsansatzes erfolgt, unabhängig davon, ob sich die Spaltung über 6 oder 24 Stunden erstreckt. Die Aktivierung durch Blausäure ist jedoch bei schwach saurer Reaktion ($p_H = 6 \cdot 6$) optimal. Die Erhöhung der Wirkung beträgt nach 6- und 24stündigem Abbau 45%, beziehungsweise 40%. Bei $p_H = 7 \cdot 0$ und $p_H = 7 \cdot 6$ ist nach 24 Stunden des Abbaues ebenfalls eine geringe Aktivierung zu beobachten, die aber

Tabelle V.

Spaltungszeit in Stunden	Zyankalizusatz in *mg*	Wirkung in *cm³* 0·2 n. NaOH/4 *cm³* Probe bei p_H = 6·3	6·6	7·0	7·3	7·5	Kasein	Puffermischung	Enzymlösung	Reaktionsmenge
6	0	0·11	**0·34**	0·75	0·46	0·38	4%	4 *cm³*	Peptonkulturfiltrat (6 Monate): 4 *cm³*	20 *cm³*
	0·65	0·08	**0·62**	0·76	0·28	0·28				
24	0	0·42	**0·52**	**0·94**	0·84	**0·69**				
	0·65	0·35	**0·87**	**1·04**	0·64	0·79				

jener bei $p_H = 6·6$ nicht annähernd gleich kommt. Versuche bei anderen Azitidäten zeigen sogar eine Minderung der Wirksamkeit. Zu ähnlichen Ergebnissen führte der Parallelversuch mit Gelatine als Spaltsubstrat. Auch hier wird die stärkste Aktivierung durch Blausäure bei $p_H = 6·6$ erreicht, sofern der 6stündige Abbau berücksichtigt wird (Tabelle VI).

Tabelle VI.

Spaltungszeit in Stunden	Zyankalizusatz in *mg*	Wirkung in *cm³* 0·2 n. NaOH/4 *cm³* Probe bei p_H = 5·7	6·3	6·6	7·0	7·4	7·6	Gelatine	Puffermischung	Enzymlösung	Reaktionsmenge
6	0	0·30	0·33	**0·18**	0·32	0·31	0·28	4%	4 *cm³*	Peptonkulturfiltrat (6 Monate): 4 *cm³*	20 *cm³*
	0·65	0·21	0·25	**0·32**	0·29	0·30	0·29				
24	0	0·44	0·51	**0·46**	**0·43**	0·34	**0·34**				
	0·65	0·46	0·48	**0·53**	**0·49**	0·36	**0·43**				

Nach 24 Stunden der Fermenteinwirkung unter dem Einfluß von Blausäure werden erhöhte Spaltwerte auch bei neutraler und schwach alkalischer Reaktion erzielt ($p_H = 7·6$).

Zum Vergleiche wurde eine dritte Versuchsreihe mit Witte-Pepton als Spaltsubstrat angeschlossen. Die Ergebnisse, welche bei wechselnder Azidität des Versuchsansatzes mit und ohne Zyankali erhalten worden sind, finden sich in Tabelle VII.

Vergleicht man die erhaltenen Abbauwerte nach 6 und 24 Stunden der Reaktionszeit, so findet man im ganzen Bereich der untersuchten p_H-Werte bei Zusatz von Blausäure erhöhte Wirkungen. Bei Berücksichtigung des 24stündigen Abbaues ergeben sich bei schwach saurer Reaktion die höchsten Aktivierungen durch Blausäure, wobei das Optimum bei $p_H = 6·9$ liegt.

Zusammenfassend geht aus den Versuchen über die p_H-Abhängigkeit der Blausäureaktivierung hervor, daß die optimale Re-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

aktion schwach sauer ist. Durch den Zyankalizusatz wird die Spaltung der Peptone besonders gefördert, wie die Versuche mit Witte-Pepton gezeigt haben. Das p_H-Optimum für die Peptonspaltung liegt nach früheren Untersuchungen (11) bei schwach saurer Reaktion.

Tabelle VII.

Spaltungszeit in Stunden	Zyankalizusatz in *mg*	Wirkung in *cm³* 0·2 n. NaOH/4 *cm³* Probe bei $p_H =$						Pepton	Puffermischung	Enzymlösung	Reaktionsmenge
		6·1	6·3	6·7	6·9	7·3	7·5				
6	0	0·02	0.07	0·08	0·09	0·09	0·09	4%	4 *cm³*	Peptonkulturfiltrat (6 Monate): 4 *cm³*	20 *cm³*
	0·65	0·15	0·17	0·14	0·14	0·17	0·17				
24	0	0·15	**0·18**	**0·19**	**0·20**	0·16	0·25				
	0·65	0·20	**0·28**	**0·28**	**0·42**	0·22	0·25				

Aus der Tatsache, daß gerade bei dieser Reaktion beim Abbau von Kasein und Gelatine durch Blausäurezusatz die stärksten Aktivierungen auftreten, kann angenommen werden, daß die beim Abbau von Kasein und Pepton entstehenden Peptone durch den Blausäurezusatz leichter aufgespalten werden. Die Proteinase des *Bacillus pyocyaneus* steht demnach dem Papain nahe, von dem sie sich allerdings hinsichtlich der p_H-Abhängigkeit unterscheidet. Die Frage, ob noch eigene Peptidasen im Proteasensystem des *Bacillus pyocyaneus* vorhanden sind, wird derzeit von uns experimentell geprüft.

Im folgenden teilen wir die Ergebnisse unserer Versuche zur Aufklärung der Blausäurewirkung mit. Wir stellten gleichzeitig Untersuchungen über die Spaltbarkeit von gewöhnlicher Gelatine (Pulvergelatine), von Gelatine unter Zyankalizusatz und von metallarmer Gelatine an, welche nach den Vorschriften von H. A. Krebs (4)

Tabelle VIII.

Art der Enzymlösung	Wirkung in *cm³* 0·2 NaOH/4 *cm³* Probe bei			Substratkonzentrat.	Enzymkonzentration	Puffermischung	Reaktionsmenge	Reaktionszeit
	Gelatine	Gelatine + 2 *mg* CNK	Gel. gerein. n. A. Krebs					
Peptonkulturfiltrat, frisch (10 täg. Zucht)	0·44	0·51	0·77	4%	3 *cm³*	4 *cm³* ($pH = 7·0$)	20 *cm³*	24 Stunden
Gelatinekulturfiltrat frisch (10 täg. Zucht)	0·27	0·29	0·45					
Gelatinekulturfiltrat dialysiert (1 Mon. alt)	0·39	0·39	0·56					

gereinigt worden war. Es standen uns nur frische Enzymlösungen zur Verfügung, welche im allgemeinen durch Blausäure kaum aktivierbar sind. Wir verwendeten ein Peptonkulturfiltrat, ein Gelatinekulturfiltrat und ein durch 24stündige Dialyse gereinigtes Gelatinekulturfiltrat.

Wie die diesbezüglichen Resultate in Tabelle VIII zeigen, wird unabhängig von der Zusammensetzung der Enzymlösung die metallarme, nach Krebs gereinigte Gelatine um 30 bis 40% stärker abgebaut als die gewöhnliche Gelatine. Vergleicht man hiemit die mittlere Kolonne der Tabelle VIII, welche die Abbauwerte für gewöhnliche Gelatine unter Zusatz von Blausäure enthält, so findet man, daß beim Peptonkulturfiltrat eine Hemmung der Wirkung, beim Gelatinkulturfiltrat eine geringe Erhöhung und beim dialysierten Gelatinekulturfiltrat die gleiche Wirkung durch den Zyankalizusatz erreicht wird. Im Anschluß daran haben wir eine Versuchsreihe ausgeführt, bei der wir einerseits die Spaltsubstrate Gelatine und Pepton und anderseits die Enzymlösung mit Zyankali versetzten. Nach einer Verweilzeit von 18 Stunden gaben wir zu den mit Blausäure vorbehandelten Substraten, beziehungsweise zu der vorbehandelten Enzymlösung, die Substrate, beziehungsweise die Enzymlösung. Die so zusammengestellten Versuchsansätze wurden nach 6 und 24 Stunden des Abbaues untersucht.

Tabelle IX.

Nr. d. Vers.	Art des Abbaues	Spaltungszeit in Stunden	Spaltung in cm^3 0·2 n. NaOH/4 cm^3		Substratkonzentrat.	Enzymlösung	Puffermischung	Reaktionsmenge
			Gelatine	Pepton				
I.	Abbau nach üblicher Art mit 9 *mg* KCN	6	0·25	0·14	4%	Peptonkulturfiltrat: 4 cm^3 (10 Monate alt)	4 cm^3 ($pH = 7·0$)	20 cm^3
		24	0·36	0·36				
II.	Substrat mit 9 *mg* KCN versetzt und nach 18h Zugabe des Enzyms	6	**0·35**	**0·18**				
		24	**0·49**	**0·42**				
III.	Enzym mit 9 *mg* KCN versetzt und nach 18h Zugabe des Substrates	6	0·24	0·15				
		24	0·39	0·34				

Wie die in Tabelle IX zusammengestellten Resultate zeigen, erhält man den tiefsten Abbau bei Vorbehandlung der Substrate mit Blausäure (Versuchsreihe 2).

Sowohl Gelatine wie Pepton verhalten sich gleich. Versetzt man die Enzymlösung 18 Stunden vor Beginn des Abbauversuches mit Zyankali, so werden nahezu dieselben Abbauwerte erzielt (Ver-

©Akademie der Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

suchsreihe 3), wie sie beim Abbau auf die allgemein übliche Art erhalten werden (Versuchsreihe 1).

Aus den Ergebnissen dieser Versuche geht hervor, daß die Wirkung der Blausäure in erster Linie auf einer Änderung des Substrates beruht, da die mit Blausäure vorbehandelten Spaltstoffe in jedem Falle stärker abgebaut werden. Diese Erscheinung mag zum Teil mit H. A. Krebs (4) auf die Entfernung der für die Fermentwirkung schädlichen Schwermetallverunreinigungen zurückzuführen sein. Doch kann auch daran gedacht werden, daß die in Betracht kommenden Substrate selbst unter dem Einfluß der Blausäure Veränderungen erleiden, die den Angriff des Fermentes erleichtern. Zur restlosen Erklärung des Blausäureeinflusses genügen diese Annahmen nicht, da die Versuche dargetan haben, daß auch die Zusammensetzung der Enzymlösung und ihr Alter für die reaktionsbeschleunigende Wirkung der Blausäure maßgebend sind. In dieser Richtung können mehrere Erklärungen in Betracht gezogen werden. Es kann das Enzym selbst (10) oder, was nach neueren Untersuchungen (14) wahrscheinlicher ist, der natürliche Aktivator des Fermentes durch die Blausäure vom inaktiven in den aktivierten Zustand übergeführt werden.

Zusammenfassung.

Die Versuche über die Blausäurewirkung auf den Eiweißabbau durch die Proteasen des *Bacillus pyocyaneus* haben zu folgenden Ergebnissen geführt:

1. Im Sinne des stärkeren Abbaues wirkt der Blausäurezusatz bei älteren Gelatine- und Peptonkulturfiltraten. Jüngere Lösungen dieser Art werden in ihrer Wirkung wenig beeinflußt, mitunter sogar mehr oder weniger stark gehemmt.

2. Bei Kulturfiltraten, welche durch Zucht des *Bacillus pyocyaneus* in Nährlösungen mit Ammonchlorid als Stickstoff- und Glyzerin als Kohlenstoffquelle erhalten worden sind, wirkt der Blausäurezusatz auch bei frischen Enzymlösungen kräftig aktivierend auf den Eiweißabbau.

3. Durch die Blausäure wird hauptsächlich die Peptonspaltung beschleunigt. Die optimale Blausäuremenge beträgt 9 *mg* pro 20 cm^3 Versuchsansatz.

4. Hinsichtlich der p_H-Abhängigkeit ergibt sich, daß der Zyankalizusatz den Abbau von Gelatine, Kasein und Pepton bei schwach saurer Reaktion ($p_H = 6 \cdot 0—6 \cdot 9$) optimal fördert.

5. Die nach H. A. Krebs von Schwermetallen weitgehend befreite Gelatine wird durch das Ferment bedeutend tiefer abgebaut als gewöhnliche und mit Zyankali versetzte Gelatine.

6. Bei Vorbehandlung der Substrate Gelatine und Witte-Pepton einerseits und der Enzymlösung anderseits mit Blausäure findet man, daß der Abbau nur im ersteren Falle wesentlich vertieft erscheint.

Literaturübersicht.

1. Vines S. H., Ann. of Bot., *17*, 597 (1903).
2. Waldschmidt-Leitz E. und Mitarbeiter, Naturwiss., *17*, 85 (1929).
3. Willstätter R. und Mitarbeiter, Zeitschr. f. physiol. Chem., *151*, 286 (1925/26); Ambros O. und Harteneck A., Zeitschr. f. physiol. Chem, *181*, 24 (1929); Graßmann W. und Dyckerhoff H., Zeitschr. f. physiol. Chem., *179*, 41 (1928); Lüers H. und Malsch L., Wochensch. f. Brauerei, *46*, 265 (1929).
4. Krebs H. A., Biochem. Zeitschr., *220*, 288 (1930).
5. Waldschmidt-Leitz E. und Mitarbeiter, Naturwiss., *18*, 644 (1930).
6. Graßmann W., v. Schönebeck O. und Eibeler H., Zeitschr. f. physiol. Chem., *194*, 124 (1931).

   Mendel L. B. und Blood A. F., Journ. biol. Chem., *8*, 177 (1910).
8. Stern K. G., Biochem. Zeitschr., *234*, 136 (1931).
9. » *240*, 192 (1931).
10. Willstätter R. und Graßmann W., Zeitschr. f. physiol. Chem., *138*, 184 (1924).
11. Gorbach G., Arch. f. Mikrobiol., *1*, 537 (1930).
12. Tarnanen I., Ann. Acad. scient. Fennicae, Serie A, Tom. XXXIII, N. 5 (1930).
13. Gorini C., Graßmann W. und Schleich H., Zeitschr. f. physiol. Chem., *205*, 133 (1932).
14. Graßmann W., Zeitschr. f. angew. Chem., *44*, 105 (1931).